

0716498-/

На правах рукописи

МАКО ГУЛАМ АСГАР

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ TRICHODERMA HARZIANUM
В ЧЕРНОЗЕМАХ ТАТАРСТАНА**



03.00.07 - микробиология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидат биологических наук**

КАЗАНЬ - 2000

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета
Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова -Ленина

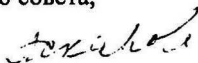
| | |
|------------------------|---|
| Научный руководитель: | кандидат биологических наук, доцент Ф. К. Алимова |
| Консультант: | доктор биологических наук, профессор Ф.Г. Куприянова - Ашина |
| Официальные оппоненты: | доктор биологических наук, профессор Л.П.Хохлова кандидат биологических наук, старший научный сотрудник М.Н. Давыдова |
| Ведущая организация: | Казанское научно-производственное объединение «Нива Татарстана» |

Защита диссертации состоится 27 Август 2000 г. в 14:30 часов на заседании
диссертационного Совета К 053.29.19. при Казанском государственном университете им.
В. И. Ульянова - Ленина, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного
университета

Автореферат разослан _____ 2000 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Н. Аскарова

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000055709

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В структуре почвенного покрова сельскохозяйственных угодий Татарстана чернозем составляет 39,3% (Молин В.О., Гареев Р.П., 1996). За последние 25 лет площади кислых черноземов в Татарстане возросли на 233,9 тыс. га (13,36%) (Мещанов В.Н. и др. 1988). При нынешних темпах подкисления все почвы Центрально-черноземных областей к 2017 году станут кислыми (Шильников И.А. 1987). В ряде областей с преимущественным распространением черноземных почв уже к настоящему времени практически не осталось нейтральных почв. Это свидетельствует о необходимости их известкования. Дальнейшее промедление с этим приемом усилит почвенные процессы по пути деградации чернозёмов - снижение кислотности и, как следствие этого, снижение фитосупрессивности и фунгистатических свойств, а значит и ухудшение фитосанитарной обстановки (Величко В.А. и др., 1991, Филипчук О.Д. и др., 1997). Так, поражаемость зерновых возбудителями корневых гнилей возросла за последние годы на 30-40%, до 80% из которых падает на долю микромицетов (Великанов Л.Л., 1997). Ухудшению фитосанитарной ситуации в Татарстане так же способствует резкое увеличение инфицированности семян возбудителями заболеваний (Прогноз..., 1998). При посеве таких семян происходит активное инфицирование растений и почвы в течение всего вегетационного периода. Предпосевное обеззараживание семян зачастую не даёт ожидаемых положительных результатов. Известно, что некоторые фунгициды - протравители не только не уничтожают заразное начало гриба, но и, напротив, способствуют развитию заболеваний растений за счёт избирательного уничтожения полезных микроорганизмов.

Биотическим фактором супрессивности кислых почв являются антагонистические и биотрофные формы микромицетов активных, против широкого спектра возбудителей заболеваний. В практике главным образом отдают предпочтение грибам-антагонистам, продуцентам антибиотиков или токсинов широкого спектра действия (виды *Trichoderma*, *Gliocladium* и др. (Великанов И.А. 1997)).

Для регуляции численности фитопатогенных грибов в почве прибегают либо к интродукции антагониста-супрессора, либо создают оптимальные условия для стабильного воспроизводства аборигенных штаммов антагонистов. Интродукция супрессоров антагонистов в почву продолжает оставаться одним из надёжных приёмов при помощи которого за короткий период удаётся реально улучшить фитосанитарную обстановку агроценоза (Филипчук О.Д. и др., 1997). Выбранный вид интродуцента должен удовлетворять ряду экологических и биотехнологических требований: высокая активность к фитопатогенным микроорганизмам, отсутствие токсичности в отношении не целевых организмов, хорошая приживаемость в тех экосистемах и тех условиях, в которых будет

использоваться этот интродуцент. Необходимо также учесть, что поиск высокоэффективных и жизнеспособных аборигенных антагонистов в условиях конкретной экологической ниши должен быть приурочен в первую очередь к почвам конкретного агрорегиона (Горленко М.В., 1975, Филиппчук О.Д. и др., 1997). Следует отметить и слабую изученность экологических последствий от применения биопестицидов в агроэкосистемах. В такого рода исследованиях природные механизмы защиты растений, априорно рассматриваются как экологически чистые в противовес химическим методам защиты растений.

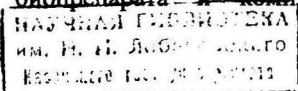
Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования явилась комплексная оценка функционирования микромицета *Trichoderma harzianum* при интродукции в выщелоченные чернозёмы Татарстана на фоне возрастающих доз известкования. В соответствии с целью исследования в работе были поставлены следующие задачи:

1. Осуществить скрининг гриба-интродуцента для биологического метода защиты из экологических ниш агрорегиона.
2. Осуществить фитоэкспертизу семян зерновых (пшеницы, ячменя и овса) и выделить возбудителей заболеваний.
3. Определить антагонистическую активность *T. harzianum* в отношении возбудителей заболеваний растений в опытах *in vitro*.
4. Оценить влияние экологической ниши и вида адсорбента, используемого при получении биопестицида, на жизнеспособность *T. harzianum*.
5. Оценить влияние *T. harzianum* на биологическую активность почв по данным микробиологического мониторинга.
6. Изучить биологическую активность чернозема в условиях интегрированного применения известкования и биопестицида.

Научная новизна. Впервые из защищённого грунта агрорегиона выделен штамм *T.harzianum* (T18), обладающий высокой антагонистической активностью к широкому спектру микромицетов - возбудителей заболеваний растений, выделенных с поверхности семян зерновых, культивируемых в Татарстане. Впервые проведено комплексное исследование жизнедеятельности микромицета - интродуцента *T.harzianum* в почве Татарстана. Показано, что *T.harzianum* оказывает положительное влияние на растения и отрицательное - на возбудителей заболеваний растений. Интродукция *T.harzianum* в чернозем как на фоне агротехнических приемов, так и без них вызывает различные изменения в функциональной активности микробного сообщества. Выщелоченный чернозем и известкование почвы оказывают влияние на жизнедеятельность *T.harzianum*.

Показано, что традиционно используемым в технологии получения триходермина сорбентам растительного происхождения, альтернативным может быть - минеральный адсорбент - цеолит (вулканогенная осадочная порода из месторождений Татарстана).

Впервые осуществлён микробиологический мониторинг выщелоченных чернозёмов Татарстана и выявлено влияние на биологическую активность почвы известкования, интродукции биопрепарата и комплексного воздействия мелиорации с биопестицидом.



Установлена возможность регулирования фитосанитарной ситуации с помощью агротехнологических мероприятий и «оперативного сдерживания» за счет интродукции *Trichoderma harzianum*.

Практическая значимость работы. Отмечаемое в течение последних лет ухудшение фитосанитарной ситуации почв в Татарстане обусловлено не только подкислением чернозема, и как следствие, снижением супрессивности почв, но и использованием семян зерновых, пораженных возбудителями заболеваний растений.

В условиях биологизации сельскохозяйственного производства возможно "оперативное сдерживание" ухудшающейся фитосанитарной ситуации микромицетами - антагонистами, являющееся экологически безопасной альтернативой химической защите растений. Восстановление супрессивности почв возможно не только благодаря агротехническим мероприятиям, но и интродукции биопестицида, сопровождающейся увеличением общей биологической активности экологической ниши.

Цеолитсодержащие породы, обладая высокой адсорбционной способностью, могут использоваться как в качестве мелиоранта, так и сорбента для антагонистов возбудителей заболеваний растений.

Апробация работы. Основные результаты исследований представлены на итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (1998, 1999, 2000 гг.), на конференции «Экологические проблемы и пути их решения в зоне среднего Поволжья», Саранск (1999 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 191 страницах, состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследования, раздела собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 17 рисунков, 20 таблиц. Список литературы содержит 130 отечественных и 150 работ зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований явился: микромицет *Trichoderma harzianum*, выделенный из защищенного грунта.

Образцы почвы: чернозем выщелоченный, среднемощный, тяжело суглинистый с содержанием гумуса 4-5%, сумма поглощенных оснований составляет 20-26 мг экв/100г почвы, pH 5,4-5,6. Почвы среднеобеспечены подвижными формами кальция. Для поддержания уровня почвенной кислотности в почву вносились возрастающие дозы Ca_2CO_3 (2, 3, 4, 5 т/га) на фоне азотно-фосфорно калийных удобрений ($\text{N}_{90}\text{P}_{90}\text{K}_{90}$).

Образцы почвы чернозема отобраны в соответствии с правилами отбора проб для микробиологического анализа со стационарных участков совхоза «Левашевский», Алексеевского района РТ (Методы..., 1991).

Микробиологические исследования семян зерновых проведены согласно рекомендациям Международной Ассоциации по испытанию семян (Наумова

Н.А. ГОСТ 12044-81 "Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями 1981").

Антагонистическую активность и конкурентоспособность *T. harzianum* определяли методом встречных культур на среде Чапека (Семонян И.К. и Мамиконян Т.С., 1982).

Адсорбенты для получения биопрепарата: шелуха (Ш) - отход трихограмного производства совхоза «Казанский тепличный», древесные берёзовые опилки (О), навозный компост (Н) - отходы животноводческого комплекса РТ, цеолит (Ц) - вулканогенная осадочная порода (Дрожжановское месторождение, РТ).

Для получения спорowego материала *T. harzianum* суспензией спор *T. harzianum* засеивали адсорбент, предварительно простерилизованный при 1,5 атм в течение 20 мин. Количество спор составляло 10^9 спор на грамм адсорбента.

Отбор спонтанных мутантов, устойчивых к высоким дозам стрептомицина (10-100 мг/мл), производился путём последовательных пересевов на твёрдую среду Чапека с возрастающими концентрациями стрептомицина. После 5-6 пересевов была получена стрептомицин устойчивая популяция *T. harzianum*. (Методы..., 1991).

Определение фунгистатического действия почвы проводили методом агаровых блоков Добба и Хансона (Методы экспер..., 1982).

Подготовку микробиологического материала для анализа и посев его на питательные среды осуществляли общепринятыми стандартными методами (Методы..., 1993; Теппер, 1993).

Для учёта количества бактерий в почве водную суспензию почвенной массы высевали на мясо-пептонный агар — МПА (аммонификаторы), крахмалоаммиачный агар — Гаузе (актиномицеты), МПА с суслом (бактерии, образующие эндогенные споры), среду Чапека (микробицеты). (Теппер Е. З. и др., 1993).

Определение биомассы микробных клеток проводили методом прямого счёта в люминесцентном микроскопе с использованием светофильтров ФС-1-2, ЖЗС-19, ЖЗС-18 (Головченко А. В. и др., 1995; Кожевин П. А., 1989; Методы почвенной биохимии, 1991).

Интенсивность разложения целлюлозы в почве определяли методом Звягинцева Д. Г. (Методы..., 1991).

Протеазную активность почвы определяли методом Мишустина и др. (Методы..., 1993).

Активность азотфиксации в почве измеряли «ацетиленовым» методом (Методы..., 1991; Гарусов А. В., 1998).

Определение активности почвенного дыхания осуществляли на газовом хроматографе (Ананьева Н. Д. и др., 1997; Гарусов А. В., 1998).

Определение фитотоксической активности почвы проводили на семенах растений (Методы..., 1993).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием стандартного пакета программ Excel, Origin.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Скрининг штаммов грибов-интродуцентов для биологического метода защиты

В отборе агентов биоконтроля, интродуцируемых в агроэкосистемы, выбранный вид микроорганизма должен удовлетворять ряду экологических и биотехнологических требований (Великанов, Сидорова, 1988; Великанов, 1997): конкурентоспособность, хорошая приживаемость в конкретных экосистемах, нетоксичность к защищаемому растению, технологичность (хороший рост и споруляция на питательных средах, лёгкость культивирования и т.д.).

1.1. Определение конкурентоспособности микромицетов-интродуцентов

С целью выявления антагонистов, перспективных для биологической защиты растений проводился скрининг микромицетов *Trichoderma* из выщелоченного чернозёма и защищённых грунтов Татарстана. Установлено, что наибольшая численность (20-30 % от общего количества микромицетов) и разнообразие *Trichoderma* (4 вида) обнаруживается в защищённых грунтах. В чернозёмах количество жизнеспособных пропагул (КОЕ / г почвы) *Trichoderma* составило всего 4% от общего числа микромицетов. Далее было проведено изучение конкурентоспособности выделенных штаммов микромицетов *Trichoderma* между собой и коллекционным штаммом *Trichoderma lignorum*, используемым тепличными хозяйствами для получения биопестицида триходермина (табл.1).

Таблица 1

Антагонистическая активность *Trichoderma* в опытах in vitro.

| Виды | Штаммы микромицета | Скорость роста (мм/час) | Встречаемость типов реакции | | | | | | Индекс антагонизм (ИА)* | Место выделения |
|--------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|---|----------------|---|---|---|-------------------------|--|
| | | | A | B | B ₁ | C | D | E | | |
| <i>T.viride</i> | T24 | 0,309±0,02 | - | 4 | 2 | 3 | 2 | - | 29 | Защищённый рунт/з «Майский» чернозём РТ |
| | T23 | 0,354±0,08 | - | 3 | 4 | - | - | 8 | 55 | |
| | T5 | 0,220±0,02 | 3 | 5 | 1 | 2 | - | - | 13 | |
| <i>T.koningii</i> | T9 | 0,220±0,01 | 2 | 3 | 5 | - | - | - | 16 | Защищённый рунт с/з «Казанский тепличный» РТ |
| <i>T.harzianum</i> | T18 | 0,350±0,01 | - | - | 3 | 1 | - | 6 | 42 | |
| | T8 | 0,416±0,05 | - | - | - | 1 | 1 | 7 | 42 | |
| <i>T.lignorum</i> | E19 | 0,204±0,03 | 4 | 5 | 2 | - | - | - | 9 | Чернозём РТ |
| | T23 | 0,237±0,02 | - | - | - | 3 | 4 | - | 25 | ВКМ г. Москва |

ИА* = $V(n*1) + B_1(n*2) + C(n*3) + D(n*4) + E(n*5)$, где ИА - индекс антагонизма; В, В₁, С... - типы реакций, выявленные видом данного гриба по отношению к другим; n - частота встречаемости данной реакции; 1-5 - баллы.

Как видно из табл.1, наибольшей скоростью роста и индексом антагонизма (ИА) обладали штаммы T23, T18, T8, выделенные из защищённых грунтов РТ. Сравнительный анализ показал, что штаммы T8 и T23 характеризовались высокой фитотоксичностью к растениям - тест-объектам и уступали штамму T18 по технологичности (уровню споруляции микромицета-антагониста на сорбенте - шелуха ячменя, используемом для получения триходермина). Для дальнейших

исследований экологических аспектов *Trichoderma* использовали штамм *Trichoderma harzianum* (T18).

1.2. Влияние экологической ниши и вида адсорбента на жизнеспособность *Trichoderma harzianum* (T18)

В качестве адсорбентов для получения биопестицида исследовали: растительные отходы (опилки), органическое соединение (прокомпостированный отход птицеводческих фабрик), минеральное вещество (цеолит) и классический сорбент, используемый в Татарстане для получения биопестицида триходермина - шелуха семян ячменя (отход трихограмного производства).

Биопестицид для интродукции в чернозём использовался в виде спор, адсорбированных на носителях. Исходное количество в почве (КОЕ / г почвы) *T.harzianum* было максимальным при интродукции биопестицида на навозе и опилках. Меньшее значение обнаружено при использовании шелухи и цеолита в качестве носителя.

Интродукция биопестицида на различных носителях в чернозём сопровождалась флуктуациями численности микромицета с максимальными значениями для опилок и навоза на 5 и 7 сутки, что составило 260×10^5 и 160×10^5 КОЕ / г почвы соответственно и минимальными значениями $< 1,0 \times 10^2$ и $0,16 \times 10^3$ КОЕ / г почвы на 30 и 60 сутки соответственно.

Trichoderma на цеолите и шелухе при интродукции в чернозём количественно флуктуирует на более низком уровне в течение 60 дней. Так, ёмкость среды для *T.harzianum*, адсорбированной на цеолите, составила $2,6 \times 10^5$ КОЕ / г почвы, а для шелухи $4,8 \times 10^5$ КОЕ / г почвы, с минимальными значениями $< 10^3$ КОЕ / г почвы на 7 и 60 сутки.

При известковании чернозёма отмечена положительная корреляция возрастающих концентраций извести с количеством интродуцентов на шелухе и цеолите (табл. 2).

Таблица 2

Коррелятивная зависимость численности *Trichoderma harzianum* на различных носителях от концентрации извести в черноземе

| Вариант адсорбента | Время (сут.) | | | | | | | |
|--------------------|---------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| | 0 | 3 | 5 | 7 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| Навоз | 0,05* | 0,38* | 0,32* | 0,26* | 0,47* | -0,18* | -0,18* | 0,55* |
| Опилки | -0,25* | -0,25* | -0,16* | -0,06* | 0,32* | -0,04* | 0,09* | -0,38* |
| Шелуха | 0,54* | 0,83* | 0,58* | 0,78* | 0,82* | 0,17* | 0,42* | -0,07* |
| Цеолит | 0,4* | 0,7* | 0,82* | 0,29* | 0,05* | -0,10* | 0,81* | 0,36* |

*- коэффициент корреляции г.

В случае использования в качестве сорбента опилок коррелятивная зависимость в динамике отрицательная, а для адсорбента - навоза характерно отсутствие коррелятивной зависимости в динамике за исключением 90 суток ($r = 0,55$).

Таким образом, кинетика *T.harzianum* в чернозёме характеризуется флуктуациями численности жизнеспособных пропагул микромицета и их стабилизацией, за исследованный период, на исходном популяционном уровне, что указывает на возможность преодоления сопротивления среды. Ёмкость среды - K (максимальное значение численности микроорганизмов данной экологической ниши) зависит для микромицета-интродукта от типа сорбента и состояния экологической ниши.

2. Взаимоотношения микромицета-интродукта с растением

Биотический аспект изучения *T.harzianum* предполагает обязательное изучение её взаимоотношения с эдификаторами, которыми являются фототрофные организмы. Значительную роль в почвоутомлении играют фитотоксические вещества, выделяемые преимущественно фитопатогенными грибами и многими сапротрофными микромицетами (Шабаев, 1998).

Почвенные сапротрофные микроорганизмы влияют на интенсивность поглощения корнями растений питательных веществ и в целом на процессы почвообразования. Продуцируя целый ряд биологически активных веществ (гормоны, антибиотики и т. д.), они принимают участие в превращении физиологически активных веществ почвы. В ходе таких превращений могут образоваться фитотоксические соединения, которые могут накапливаться в почве до уровня действующего начала на растения (Шатохин, 1998).

Из общего микробного населения почвы наибольшее количество токсинообразователей приходится на долю микроскопических грибов, меньше их среди бактерий и актиномицетов (Головкин, Кострюк, 1987).

2.1. Токсичность *Trichoderma harzianum* к растениям - тест-объектам *in vitro* и *in vivo*.

Так как изоляты исследуемого штамма *T. harzianum* предполагается вносить как на поверхность семян, так и в ризосферу растений, предварительно необходимо было проверить способность микромицета-интродукта к токсинообразованию. По данным литературы известно, что $\approx 40\%$ *T.harzianum* являются токсинообразователями (Сейкетов Г.Ш., 1982). В опытах *in vitro* нами была проверена фитотоксичность культуральной жидкости *T. harzianum* по отношению к проросткам семян редиса, кресс салата и кукурузы. По данным опыта *T. harzianum* можно отнести к микромицетам с ростстимулирующим действием.

В опытах *in vivo* нами было проведено определение фитотоксичности самого чернозема, а также влияние биопестицида и извести на степень почвоутомления методом биотеста (с проростками семян кукурузы). Выщелоченный чернозём не является фитотоксичным в отношении проростков кукурузы и в динамике

оказывает стимулирующий эффект на прорастание семян. Возрастающие дозы извести также не вызывают угнетения роста тест-объектов.

Интродукция *T.harzialum* в почву оказывает различное воздействие на уровень токсичности почвы. Интенсивность воздействия микромицета на растение зависит от типа сорбента, используемого при получении биопестицида, и времени инкубации. *T.harzialum*, адсорбированная на цеолите и шелухе, на 30 сутки стимулирует прорастание семян кукурузы на 100% и 78% соответственно. На 60 сутки при адсорбции микромицета на опилках отмечено незначительное стимулирование прорастания тест-объекта по сравнению с контролем. На 90 сутки проявляется слабый фитотоксический эффект в вариантах с микромицетом, адсорбированным на цеолите и шелухе.

При комплексном воздействии биопестицида и извести на фитотоксичность почвы отмечено отсутствие токсического влияния на растение. На фоне мелиорации и интродукции *Trichoderma*, адсорбированной на навозе, происходит незначительное стимулирующее действие на 30 сутки (37%) по сравнению с контролем и на 90 сутки при адсорбции *T.harzialum* на опилках и шелухе - на 54% и 34% соответственно.

Известно, что *T.harzialum* оказывает как ингибирующее, так и стимулирующее действие на рост растения (Сейкетов Г. Ш., 1982, Оразов Х.Н. 1989). Продукты жизнедеятельности *T.harzialum* *in vitro* в большинстве случаев оказывают ингибирующий эффект, но в условиях почвы высокая концентрация продуктов жизнедеятельности никогда не сохраняется надолго, поэтому чаще проявляется стимулирующее или слабовыраженное ингибирующее действие. Однако метаболиты микромицета могут накапливаться в почве и давать картину высокой токсичности. Снижение токсического эффекта на фоне антропогенного воздействия, вероятно, связано с низкой концентрацией метаболитов или увеличением образования ростстимулирующих веществ.

Таким образом, *T.harzialum*, адсорбированная на цеолите и шелухе, оказывает стимулирующее действие на растение на 30 сутки после интродукции с последующим незначительным ингибированием на 90 сутки. На фоне мелиорации стимуляция прорастания семян отмечена для микромицета, адсорбированного на опилках и навозе, и незначительный ингибирующий эффект - для биопестицида на шелухе.

2.2. Антагонистическая активность *T. harzialum*. к возбудителям заболеваний растений

Для изучения антагонистической активности микромицета-интродуцента нами были выделены местные штаммы микроорганизмов возбудителей заболеваний растений с поверхности семян зерновых, культивируемых в исследуемой нами экологической нише.

Исследование микромицетного сообщества семян зерновых, культивируемых в РТ, позволило выяснить общую микромицетную нагрузку и обнаружить заражённость семян различными возбудителями заболеваний растений (табл. 3).

С семян пшеницы, овса и ячменя выделено всего 30, 38, 22 вида микромицетов, соответственно. Из них на семенах пшеницы обнаружено 8, на семенах овса 5 и на семенах ячменя 7 видов возбудителей заболеваний растений.

Определение видового состава фитопатогенных микромицетов позволило установить, что на зернах пшеницы, ячменя и овса он существенно различается.

Таким образом, фитоэкспертиза семян зерновых показала высокую инфицированность их разными видами микромицетов, что свидетельствует о неблагоприятном фитосанитарном состоянии семян Татарстана.

Таблица 3

Видовой состав микромицетов, вызывающих заболевания растений, с семян пшеницы, овса и ячменя.

| Виды микромицетов | Пшеница | Ячмень | Овёс |
|------------------------------|---------|--------|------|
| <i>Alternaria alternata</i> | + | + | + |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i> | + | + | |
| <i>Cephalosporium roseum</i> | | | + |
| <i>Cladosporium herbarum</i> | + | | |
| <i>Drechslera graminea</i> | + | | |
| <i>Fusarium avenaceum</i> | | | + |
| <i>Fusarium graminearum</i> | + | | + |
| <i>Fusarium solani</i> | | + | |
| <i>Puccinia graminis</i> | | + | |
| <i>Rhizoctonia cerealis</i> | + | | |
| <i>Sclerotinia</i> spp. | + | | |
| <i>Trichotecium roseum</i> | + | + | + |
| <i>Ustilago hordei</i> | | + | |
| <i>Ustilago nuda</i> | | + | |

(+) - наличие, (-) - отсутствие данного вида микромицетов на зернах.

Для проверки антагонистической активности *T.harzianum* были использованы выделенные с поверхности семян зерновых местные штаммы возбудителей заболеваний (Табл.4).

При этом для 9 штаммов микромицетов характерным является Е тип реакции (подавление одного организма при контакте; рост антагониста поверх колонии подавляемого организма по типу паразитизма). Степень колонизации антагонистом *Trichoderma harzianum* поверхности колонии фитопатогенного микромицета на третий день (С,%) зависит от его вида. Наибольшее подавление роста уже на третий день отмечено для *Botrytis cinerea*, *Cephalosporium roseum*, *Fusarium avenaceum*, для которых процент колонизации (С,%) составил 33,3 , 36,6 и 66,6 соответственно. Как видно из табл.2, рост фитопатогенных микромицетов под действием *Trichoderma harzianum* резко снижается. Наибольшее подавление роста фитопатогенных микромицетов антагонистом отмечено для *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia cerealis* и *Bipolaris sorokiniana*, для которых степень подавления скорости роста на 7 день (RI) составила 97,7 , 92,2 и 94 % соответственно. Отсутствие антагонизма - А тип реакции (смешанный рост двух

микромицетов), показан только для *Botrytis cinerea*. Подавление возбудителя заболевания антагонистом при контакте, то есть за счет выделяемых в среду антибиотиков (Д - тип реакции) обнаружен у трех видов микромицетов: *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium solani*, *Phytophthora infestans*.

Таблица 4

Антагонистическая активность *T.harzianum* к микромицетам- возбудителям заболеваний.

| Микромицеты - возбудители заболеваний (Тест-объект) | С, %* | RI, %** | Тип антаганисти- ческой активности | Скорость роста тест-объекта (мм/час) на 7 сутки | |
|--|----------|------------|---|---|-------------------------------------|
| | | | | R ₂ до взаимод. | R ₁ после взаимод. |
| <i>Alternaria alternata</i> | 20 | 78,4 | Е | 0,166 | 0,036 |
| <i>Alternaria brassicae</i> | 20 | 81,8 | Е | 0,196 | 0,036 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 33,3 | 88,8 | А | 0,535 | 0,060 |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i> | 10,0 | 94,0 | Д | 0,297 | 0,018 |
| <i>Cephalosporium roseum</i> | 36,6 | 42,1 | Е | 0,113 | 0,065 |
| <i>Colletotrichum corda</i> | 23,0 | 91,7 | Е | 0,505 | 0,042 |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 26,6 | 91,1 | Е | 0,535 | 0,048 |
| <i>Fusarium solani</i> | 6,6 | 88,2 | Д | 0,101 | 0,012 |
| <i>Fusarium avenaceum</i> | 66,6 | 69,2 | Е | 0,386 | 0,119 |
| <i>Fusarium graminearum</i> | 30,0 | 47,0 | Е | 0,101 | 0,054 |
| <i>Phytophthora infestans</i> | 6,6 | 97,7 | Д | 0,535 | 0,012 |
| <i>Rizoctonia cerealis</i> | 23,3 | 92,2 | Е | 0,535 | 0,042 |
| <i>Verticillium beticola</i> | 26,6 | 86,2 | Е | 0,345 | 0,048 |

*C(%)=ДТ/ДЕ*100, где ДЕ - расстояние между микромицетами, ДТ-расстояние, проходимое антагонистом за 3 суток.

**RI(%)=R₂-R₁/R₂*100

Итак, для выделенного нами аборигенного штамма *Trichoderma harzianum* установлена высокая антагонистическая активность в отношении широкого спектра возбудителей заболевания растений.

3. Микробиологический мониторинг агроэкосистемы на фоне биопестицида

При использовании биологического метода защиты растений в агроэкосистемах практически не учитывается тот факт, что агенты биоконтроля могут оказывать воздействие не только на возбудителей заболеваний растений, но и на другие микроорганизмы. Экологические последствия от применения биологических препаратов в агроэкосистемах пока мало изучены (Великанов, 1997). Поэтому необходимо оценить экологические последствия в агроэкосистемах при биологических методах защиты растений.

3.1. Изменение суммарной биомассы и активной биомассы микроорганизмов чернозёма РТ

Общая биомасса микроорганизмов является составной частью почвенного органического вещества, его наиболее подвижной фракцией. Считается, что её величина может служить одним из важнейших показателей истинной работы микробиоценоза в данной экосистеме (Толенская и др., 1995; Мосина, 1996; Kussel, 1997).

В динамике не отмечено значительных колебаний в суммарной биомассе микроорганизмов, величина которой составляет для чернозема Татарстана $\sim 2 \text{ г} \times 10^{-5} / \text{г}$ почвы. Нами было показано, что известкование чернозема не вызывало достоверных различий в запасе биомассы микроорганизмов. Только в одном варианте опыта, в чернозёме с начальной стартовой дозой извести 4 т/га, отмечено достоверное возрастание биомассы микроорганизмов на 90 сутки ($\sim 11,8 \text{ г} \times 10^{-5} / \text{г}$ почвы). Интродукция биопестицида, адсорбированного на растительных сорбентах, оказывает достоверное влияние на суммарную биомассу микроорганизмов, ($r=0,71$; $r=1$). При комплексном воздействии изменение в общей биомассе отмечено в случае интродукции в чернозём конидий, адсорбированных на цеолите и шелухе.

Величина общей биомассы микроорганизмов сама по себе не позволяет судить о функционировании комплекса микроорганизмов почвы и указывает только на запас микроорганизмов определенного типа почвы (Звягинцев Д.Г., 1987). Особенности его функционирования обычно оцениваются исходя из величины активной биомассы ($\text{мг С} / 100 \text{ г}$ почвы), определяемой по интенсивности выделения CO_2 из почвы, обогащённой субстратом (V_{sir}) (Благодатская Е.В., Ананьева Н.Д., 1996). В опытах с возрастающими дозами извести нами отмечено достоверное влияние мелиорации и интродукции биопестицида на увеличение углерода активной биомассы микроорганизмов. При комплексном воздействии углерод активной биомассы в микробиоценозе на 60-90 сутки снижается. Учитывая, что количество активной биомассы, определяемой при пересчете из величины скорости V_{sir} , не дает представления об активности микроорганизмов (Благодатская Е.В., Ананьева Н.Д., 1996), вычисляли величину V'_{sir} ($V'_{\text{sir}} = V_{\text{sir}_{\text{опыт}}} / V_{\text{sir}_{\text{контр}}} 100\%$), которая характеризует активность микробного сообщества почвы. Мы установили, что по данным V'_{sir} интенсивность деятельности активной биомассы в чернозёме возрастает \sim в 2-3 раза лишь на 30 сутки после антропогенного воздействия. Эффект этой деятельности нивелируется уже на 60-90 сутки, когда наблюдается тенденция к снижению метаболизма микробиоценоза.

Биопестицид, независимо от типа сорбента, оказывает положительное влияние на активность микроорганизмов чернозёма. Исключением являются опыты с применением биопестицида, адсорбированного на опилках, для которых стимуляция показана только на 60 сутки. Однако, на фоне известкования биопестицид оказывает положительное влияние только в первые 30 дней, в

дальнейшем отмечен отрицательный тип воздействия на активность микробиоценоза.

Таким образом, антагонист оказывает достоверное воздействие на запас общей биомассы микроорганизмов только при комплексном воздействии биопестицида с известью и только в случае интродукции в чернозём конидий, адсорбированных на цеолите и шелухе. Степень активности микробиоценоза возрастает при интродукции микромицета практически во всех вариантах опыта с использованием всех исследуемых адсорбентов в динамике. Наиболее достоверное возрастание активности сообщества отмечено при интродукции *Trichoderma* на шелухе и цеолите как при комплексном воздействии (на фоне мелиорации), так и без ($r = 0,7$ и $0,8$ соответственно).

3.2. Изменение интенсивности «дыхания» чернозёма РТ

На основании анализа изменения таких параметров как V_{bas} (скорость выделения CO_2 из небогатой почвой) и Q_R (соотношения V_{bas} / V_{sir}) можно оценить влияние внешних факторов на микробное сообщество почвы (Ананьева Н.Д. и др. 1997).

Известно, что V_{bas} отражает доступность органического вещества для микроорганизмов, а V'_{bas} - направленность процесса разрушения (ингибирование или стимулирование). Оказалось, что под влиянием мелиорации доступность органического вещества для микроорганизмов в течение первых 60 дней возрастает по сравнению с контролем и снижается на 90 сутки. Интродукция *T.harzianum* на различных адсорбентах увеличивает положительный эффект мелиорации на V_{bas} . Наибольший положительный эффект показан для опилок как адсорбента для микромицета.

Исследование динамики изменения коэффициента микробной активности Q_R отражает степень нарушения сообщества почвенных микроорганизмов, вызванное низкими значениями pH и др., а по значениям V'_{bas} , V'_{sir} и Q'_R можно сделать вывод о причинах нарушений в микробном сообществе и возможности преодоления стресса (Благодатская, 1996г). Нами показано, что сам чернозём характеризуется слабым нарушением устойчивости микробного сообщества ($Q_R = 0,07 - 0,28$). Используемые в работе методы мелиорации несколько увеличивают устойчивость сообщества, т.к. отмечена тенденция к снижению величины Q_R (до $0,02 - 0,18$). По синэкологической шкале оценки влияния внешних факторов на микробное сообщество (Благодатская Е.В., Ананьева Н.Д. 1996) интервал значений Q_R $0,1-0,2$ указывает на отсутствие нарушения устойчивости микробиоценоза. Интродукция микромицета *Trichoderma* позволила выявить слабое влияние его лишь в случае использования в качестве адсорбента опилок.

При изучении комплексного воздействия биопестицида и известкования отмечено отсутствие изменения состояния микробного сообщества.

Таким образом, известкование и использование биопестицида вызывают стимуляцию почвенного дыхания, не сопровождающуюся нарушением устойчивости микробиоценоза почвы.

3.3. Количественная оценка соотношения ферментативной активности с биомассой микроорганизмов

К настоящему времени показана корреляция между ферментативной активностью и количеством биомассы микроорганизмов. Для выявления достоверных связей между параметрами функциональной активности микроорганизмов и текущих почвенных процессов нами изучался коэффициент K_{MA} , отражающий скорость микробиологической деградации органического субстрата в условиях антропогенного воздействия с учётом действия пула ферментов (Сорокин Н.Д.1993). Вместе с тем, показатели Q_R , V_{bas} , V_{sir} отражают лишь интенсивность элиминации CO_2 , определяющуюся деятельностью жизнеспособных микроорганизмов, растений и химических процессов в почве. В то же время пул ферментов почвы представлен экзоферментами - продуктами жизнедеятельности живых микроорганизмов, так и эндоферментами, накапливаемыми в экологической нише после гибели клеток (Звягинцев Д.Г.,1987).

Представляло интерес оценить напряженность микробиологических процессов также и по интенсивности разложения клетчатки в почве, характеризующей энергию круговорота углерода, и по общей протеазной активности, характеризующей энергию круговорота азота почвенными микроорганизмами. Отношение суммы параметров интенсивности разложения органического вещества к общей биомассе позволяет нам оценить «производительность» микроорганизмов. ($K_{MA} = \text{Целлюлаза} + \text{Протеаза} / \text{микробная биомасса}$).

Известно, что коэффициенты микробиологической активности в почвах различных регионов значительно отличаются (Сорокин Н.Д. 1993). Для выщелоченного чернозема Татарстана значения K_{MA} колеблются в пределах от 0,68 до 4,5, что указывает на то, что в динамике наблюдается активизация процессов трансформации органического вещества, в микробиоценозе преобладает гетеротрофный компонент (гидролитиков и копитрофов), интенсивно протекают процессы минерализации. Таким образом, микробиоценоз чернозёма характеризуется сменой активности в микробном сообществе от олиготрофного блока к гетеротрофному. На фоне мелиорации отмечено возрастание активности гетеротрофного блока микроорганизмов в 2-3 раза уже в первые 30 суток, вероятно, за счет возрастания, вследствие известкования, количества доступного органического вещества и ферментативной активности. В дальнейшем, в динамике уменьшается индекс гетеротрофности и возрастает олиготрофность почвы. Отмечена тенденция к снижению величины K_{MA} в 2-4 раза. Исключением явилась активность ферментов в почве на фоне извести в концентрации 5 т/га, когда было отмечено пролонгирование эффекта возрастания величины K_{MA} по сравнению с контролем. Аналогичная картина была отмечена нами и в опытах по изучению влияния биопестицида на величину K_{MA} — интродукция *T.harzianum* на всех сорбентах, за исключением опилок, вызывает увеличение K_{MA} в 2-3 раза только на 30 сутки. Изучение комплексного воздействия мелиорации и биопестицида также позволило выявить стимуляцию уже на 30 сутки деятельности гетеротрофного блока и активизацию

олиготрофного блока в последние дни, что может быть следствием быстрой трансформации доступного субстрата.

Таким образом, и мелиорация, и биопестицид оказывают достоверное положительное влияние на активность гетеротрофного блока микробиоценоза, пул микробных ферментов и их активность на начальных этапах сукцессии микробного сообщества в микрэкосистемах.

3.4. Изменение азотфиксирующей активности чернозёма РТ

Известно, что потенциальная азотфиксирующая способность почвы является одним из показателей уровня ее биологической активности (Андреюк Е.И. и др., 1988, Микроорганизмы и охрана ..., 1989, Марфенина О.Е., 1991). Изучение влияния внешних факторов на процесс потенциальной азотфиксации показало, что сам исходный чернозём характеризуется незначительным начальным уровнем азотфиксации и возрастанием его на 90 сутки исследования с 30 до 226 (мг/ кг*ч). Мелиорация стимулирует потенциальную активность азотфиксации почвы только на 30 сутки опыта. Оптимальной для стимуляции азотфиксирующей активности можно считать дозу извести 4 т/га, когда был отмечен максимальный эффект стимуляции (в 5-9 раз по сравнению с контролем) в течение всего опыта. Последующее увеличение дозы извести до 5 т/га оказывает ингибирующий эффект на потенциальную азотфиксирующую активность чернозема.

Интродукция *T.harzianum*, адсорбированной на шелухе и опилках, оказывает в различной степени стимулирующее действие на сообщество азотфиксирующих микроорганизмов в зависимости от времени и типа сорбента. Максимально положительный уровень азотфиксирующей активности почвы составил для опытов с интродукцией *Trichoderma*, адсорбированной на шелухе, - 959 (мг/ кг*ч), для опытов с биопестицидом на опилках - 485 (мг/ кг*ч). При комплексном воздействии биопестицида и известкования почвы сохраняется наблюдаемый эффект стимуляции потенциальной азотфиксирующей активности с возрастанием доз извести (от 2 до 4 т/га), а для цеолита также и в случае концентрации извести - 5 т/га.

Таким образом, в динамике интенсивность азотфиксации только на 30 сутки в незначительной степени коррелирует с интенсивностью мелиорации ($r=0,4$). Биопестицид как на растительных, так и минеральных сорбентах оказывает положительное влияние на азотфиксирующую активность почвы ($r=0,7$ и $0,98$ соответственно). При комплексном воздействии биопестицида и извести достоверная положительная корреляция с уровнем азотфиксации в динамике показана для *Trichoderma*, адсорбированной на цеолите ($r=0,69-0,98$) и отрицательная для *Trichoderma*, адсорбированной на растительных сорбентах ($r=-0,96$).

3.5. Изменение общей биологической активности чернозёма РТ

Для оценки общей биологической активности (БА) почвы, рассматриваемой как суммарный результат сопряженно протекающих микробиологических и

биохимических процессов, использовали метод относительных единиц. По каждому определяемому биологическому показателю давалась относительная оценка его изменения по вариантам опыта (Карягина Л.А., 1982). В показатель БА нами были включены следующие величины: общая и активная микробная биомасса, интенсивность дыхания и азотфиксации, протеазная активность, интенсивность разложения целлюлозы. При этом наибольший показатель принят за 100 единиц.

В черноземе уровень БА возрастает со временем с 48,3 относительных единиц (отн. ед.) до 234,05 (рис. 1). Биопестицид в динамике оказывает различное воздействие на БА - от индифферентного до стимуляции или ингибирования. При этом степень и тип воздействия зависят от типа адсорбента и времени. Нашими исследованиями была показана стимуляция БА на 30 день после начала опыта ($r=0,45$). Отмечена положительная зависимость в динамике изменения БА почвы от количества жизнеспособных пропагул *T.harzianum*, адсорбированной на опилках ($r=0,92$), для остальных сорбентов нами установлена слабая зависимость ($r=0,45$).

В случае мелиорации отмечена также общая тенденция к увеличению уровня БА почвы в первые 30 дней для всех исследуемых доз извести ($r=0,67$). Отмечена тенденция к возрастанию степени положительного влияния на 30 день в случае применения минеральных удобрений и извести в дозах 2-3 т/га. Дальнейшее увеличение интенсивности известкования почвы сопровождалось снижением БА примерно до уровня контроля.

При комплексном воздействии известкования и биопестицида была также отмечена стимуляция общей БА почвы в первые 30 дней для всех вариантов опыта. В дальнейшем пролонгирование наблюдаемого нами эффекта стимуляции зависило от типа сорбента и экологической ниши. Так, микромицет, адсорбированный на навозе и цеолите, в динамике на 60 - 90 день оказывал только ингибирующий эффект независимо от доз извести.

Использование растительных типов сорбентов для микромицета-интродуцента позволило пролонгировать стимуляцию БА почвы до 60 дней на фоне возрастающих концентраций извести.

Таким образом, уровень БА чернозема, определяющий супрессивность почвы, может быть увеличен на ранних этапах как отдельным, так и комплексным воздействием исследуемых факторов (мелиорация и биологическая защита). Эффект пролонгирования стимуляции БА чернозема может быть достигнут только при одновременном использовании биопестицида на растительных сорбентах и известкования.

ВЫВОДЫ

1. Выделен аборигенный штамм микромицета *Trichoderma harzianum* (T18), для которого показана высокая конкурентоспособность к микромицетам того же рода, ростстимулирующие свойства по отношению к растениям, технологичность и антагонистическая активность к широкому спектру возбудителей заболеваний.

2. Семена зерновых, культивируемых в Татарстане, характеризуются высокой обсемененностью как сапротрофными видами микромицетов, так и

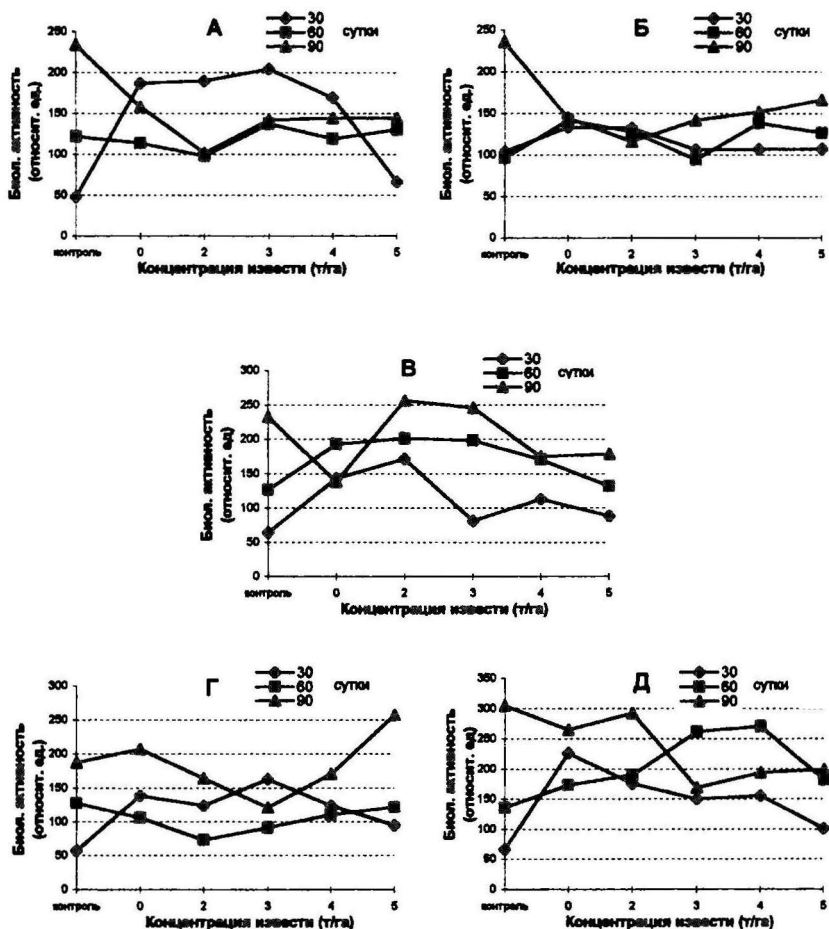


Рис. 1 Динамика показателя общей биологической активности почвы в относительных единицах на фоне известкования и интродукции биопестицида на различных адсорбентах.

А — влияние известкования

Комплексное влияние известкования и биопестицида, адсорбированного на навозе (Б), - опилках (В), - цеолите (Г), - шелухе (Д).

микромицетами-возбудителями заболеваний. Это свидетельствует о низком качестве посевного материала, неэффективности современных методов протравливания пестицидами и ухудшении фитосанитарной ситуации в регионе.

Биопестицид триходермин на основе *Trichoderma harzianum* (T18) является экологически безопасным средством оздоровления посевного материала.

3. Чернозем является благоприятной средой обитания для *Trichoderma harzianum*, так как после интродукции численность микромицета в течение 90 дней стабилизируется на исходном популяционном уровне. Максимальное количество жизнеспособных пропагул *Trichoderma harzianum* в агроэкосистеме обнаруживается при интродукции на минеральном адсорбенте (цеолит), который по сорбционным свойствам не уступает традиционно используемому в тепличных грунтах Татарстана растительному адсорбенту (шелуха). Следовательно, жизнеспособность микромицета интродуцента в почве зависит от типа экологической ниши и используемого адсорбента для получения биопестицида.

4. Показана положительная корреляционная зависимость численности жизнеспособных пропагул микромицета от проводимых в чернозёме агротехнических мероприятий (применение известкования в возрастающих дозах) лишь в случае адсорбции *Trichoderma harzianum*, на цеолите и шелухе.

Следовательно, адаптивные свойства у микромицетов интродуцентов в агроценозе на фоне антропогенной нагрузки можно увеличить при правильном экологически обоснованном применении адсорбента.

5. Микромицет-интродуцент оказывает влияние в почве на структуру микробного сообщества и его функциональную активность. Это свидетельствует о том, что в почве микромицет-интродуцент оказывает влияние не только на микромицеты возбудители заболеваний (организмы мишени), но и на организмы "не мишени".

6. Биопестицид оказывает влияние на общую биологическую активность почвы. Отмечена стимуляция отдельных параметров активности микробного сообщества в зависимости от типа адсорбента в динамике. Максимальная способность к стимуляции общей биологической активности показана для микромицета, адсорбированного на шелухе. Это указывает на то, что тип адсорбента для микроорганизма в почве может оказывать влияние не только на жизнеспособность, но и увеличивать их метаболическую активность.

7. Отмечена положительная корреляция между уровнем биологической активности чернозёма и количеством *T.harzianum*, адсорбированной на растительном сорбенте, а на фоне мелиорации — с количеством микромицета-интродуцента, адсорбированного на цеолите. Это свидетельствует о том, что биопестицид оказывает влияние на биологическую активность почвы. Тип воздействия определяется экологической нишей и видом сорбента, используемого для получения биопрепарата.

Список публикаций по теме диссертации

1. Алимова Ф. К., Мако Г., Киямова С. Н., Камалетдинова Г. М. Влияние интродукции рода *Trichoderma* на биологическую активность чернозёма РТ в

200

- условиях антропогенной нагрузки // Экологические проблемы и пути их решения в зоне Среднего Поволжья, Саранск, 1999, стр. 124-125.
2. Alimova F. K., Fattakhova A. N., **Mako G.** The soil biological activity after the new trichodermin introduction. 9-th International Congress of Mycology, Sydney, 1999.
 3. Alimova F. K., Fattakhova A. N., Zakharova N. G., **Mako G.** The antagonistic activity against the phytopathogens and chitinase levels in biocontrol agent *Trichoderma harzianum* G432 grown on the food industry wastes. // Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research only. (в печати).
 4. **Мако Г.**, Алимова Ф. К., Захарова Н. Г., Опыт применения триходермина на основе местных штаммов микромицетов // «Нива Татарстана». 2000, №4.
 5. **Mako G.**, Alimova F. K., Zakharova N. G., Fattakhova A. N., Garusov A. V. The microbiological monitoring of seeds. // Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research only. (в печати).
 6. **Мако Г.**, Алимова Ф. К., Камалетдинова Г. М. Экологические аспекты *Trichoderma harzianum* в чернозёмах РТ. Деп. ВИНТИ, № 2297-B99, 19с., 1999.
 7. **Мако Г.**, Алимова Ф. К., Митрофанов Е. Г. Влияние *Trichoderma harzianum* на дыхание и азотфиксирующую активность чернозёма РТ. Деп. ВИНТИ, № 2298-B99, 18с., 1999.

